

⑫ 公開特許公報 (A)

平3-65192

⑥Int.Cl.⁵

C 12 P 7/18

識別記号

庁内整理番号

6742-4B※

⑬公開 平成3年(1991)3月20日

審査請求 未請求 請求項の数 18 (全11頁)

④発明の名称 1, 3-プロパンジオールの発酵的製法

②特 願 平1-228160

②出 願 平1(1989)9月1日

優先権主張 ③1988年9月1日③西ドイツ(DE)③P3829618.7

⑦発明者 ヨーゼフ・クレトシュ ドイツ連邦共和国 4018 ランゲンフェルト、フリーデンマン
スシュトラアセ 19番⑦出願人 ヘンケル・コマンディ ドイツ連邦共和国 4000 デュッセルドルフ・ホルトハウ
ツトゲゼルシヤフト・ゼン、ヘンケルシュトラアセ 67番
アウフ・アクチエン

⑦代理人 弁理士 青山 葵 外1名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

1, 3-プロパンジオールの発酵的製法

2. 特許請求の範囲

1. 微生物によりグリセロールを1, 3-プロパンジオールに変換する方法であって、まず、標準的な発酵条件下に5重量%グリセロール溶液を单一の炭素源として体積/時間収率0.5g/h/2以上でグリセロールを1, 3-プロパンジオールに変換する微生物株を、クロストリジウム、エンテロバクテリウム、ラクトバチルス、バチルス、シトロバクター、エロバクターおよびクレブシラ属から選択し、次いで、その株を、嫌気的条件下に一定のpHでグリセロールを单一の炭素源として5~20重量%グリセロール溶液の工業的な変換に用い、グリセロールが殆ど消費された後、生成したバイオマスを分離し、生成物混合物を蒸留により処理することを特徴とする方法。

2. 工業用グリセロール、とりわけトリグリセリドの工業的加工により得られる工業用グリセロ

ール溶液をグリセロール溶液として使用する請求項1記載の方法。

3. 脂肪をケン化および/またはエステル交換することによって得られるグリセロール溶液を、該グリセロール水相の後処理を行うことなくグリセロール溶液として使用する請求項1または2記載の方法。

4. ラウリン酸含量の低い脂肪をケン化することによって得られるグリセロール溶液をグリセロール溶液として使用する請求項1~3のいずれかに記載の方法。

5. グリセロール濃度を5~20重量%、好ましくは10~15重量%とする請求項1~4のいずれかに記載の方法。

6. pHを6~9、好ましくは6.5~8の範囲内で一定に保つ請求項1~5のいずれかに記載の方法。

7. 微生物株を、クロストリジウム・バーフリンジエンス、クロストリジウム・バストイリアヌム、クロストリジウム・アセトブチリクム、クロ

ストリジウム・ブチリクム、酪酸クロストリジウム、クロストリジウム・バイエリンキ、クロストリジウム・カントントイ、ラクトバチルス・ブレビス、ラクトバチルス・ブフェリ、シトロバクター・フロインディ、アエロバクター・アエロゲネス、クレブシェラ・ニューモニエ、シトロバクター・インターメジウム、クレブシェラ・アエロゲネスおよびクレブシェラ・オキシトカから成る群から選択する請求項1～6のいずれかに記載の方法。

8. 酪酸クロストリジウムSH1(DSM5431)および/または酪酸クロストリジウムAK1(DSM5430)、および/または1,3-ブロバンジオールを生成し得るそれらの突然変異体または変種を使用する請求項1～7のいずれかに記載の方法。

9. クレブシェラ・ニューモニエ(DSM2026)および/または1,3-ブロバンジオールを生成し得るそれらの突然変異体または変種を使用する請求項1～7のいずれかに記載の方法。

を分離し、その後濃縮物を1,3-ブロバンジオールと他の低揮発性成分とに分留する請求項1～14のいずれかに記載の方法。

16. 低エネルギー供給、好ましくはエネルギー供給1.0KWh/m³・h、より好ましくは0.75～0.2KWh/m³・hで発酵槽内で発酵を行う請求項1～15のいずれかに記載の方法。

17. 層流搅拌機付き発酵槽内で発酵を行う請求項1～16のいずれかに記載の方法。

18. 発酵のための接種物の量が5～20体積%、好ましくは8～10体積%である請求項1～17のいずれかに記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、好ましくは嫌気性の微生物によって工業的規模でグリセロールを1,3-ブロバンジオールに変換する方法に関する。

[従来の技術]

脂肪酸トリグリセリドの脂肪酸誘導体(例えば脂肪酸メチルエステルまたは脂肪アルコール)へ

10. クレブシェラ・オキシトカNRC300および/または1,3-ブロバンジオールを生成し得るそれらの突然変異体または変種を使用する請求項1～7のいずれかに記載の方法。

11. 密着源として酵母エキスを含有する塩発酵培地の存在下に行う請求項1～10のいずれかに記載の方法。

12. 微量元素亜鉛、鉄、マンガン、銅、コバルト、ホウ素およびモリブデンの存在下に発酵を行う請求項1～11のいずれかに記載の方法。

13. 搅拌エネルギー供給により、27～40℃の発酵温度を保つ請求項1～12のいずれかに記載の方法。

14. 生成するバイオマスをメンプランフィルタープレスによってパッチ式に分離するか、またはミクロ過濾によって連続的に分離する請求項1～13のいずれかに記載の方法。

15. バイオマスの分離後、有用生成物を含有する液相から、蒸発器内で水の一部と低沸点成分とを除去し、次いで薄層蒸発器内で不揮発性成分

の油脂化学的変換において、該トリグリセリドの分解によってグリセロールが生成する。

とりわけ嫌気性微生物を含む多くの微生物がグリセロールによって増殖可能であり、その過程でグリセロールを他の生成物に変換し得ることは、科学文献により既知である。この過程において見られる代謝産物の一つが1,3-ブロバンジオールである。

1,3-ブロバンジオールは、多くの用途を持つジオールであり、原則としてエチレングリコール、プロピレングリコールまたはブタンジオールと同様の目的に使用し得る。これまで、1,3-ブロバンジオールは、アクロレインに水を付加し、次いで水素化することによって得ていた。しかし、その化学的工程には非常に費用がかかるので、得られる最終生成物は、その高価格の故に多くの適用には不適当である。

微生物によるグリセロールの1,3-ブロバンジオールへの変換は、科学文献において若干の記載がある。すなわち、ケモスタッフ培養における

クレブシェラ・アエロゲネスN C T C 4 1 8によるグリセロールの代謝が、ストリークストラ(H. Streekstra)ら、アーカイブズ・オブ・ミクロビオロジー(Arch. Microbiol.)(1987)、147:268~275に記載されている。この文献には、種々の培地における特定のクレブシェラ・アエロゲネス株のグリセロールに対する作用が記載されているが、工業的工程のためのそのような微生物の特定の代謝作用について当業者が評価し得るようなことは記載されていない。

[発明が解決しようとする課題]

本発明の課題は、グリセロールを1,3-プロパンジオールに変換するための工業的に行い得る方法を提供することである。とりわけ、そのような方法は、トリグリセリドの工業的加工において生じるグリセロール水を出発物質として使用することを意図するものである。

とりわけ、本発明の課題は、工業的規模での発酵が容易であり、標準的な発酵条件下に0.5g/h以上/の体積/時間収率でグリセロールをプロ

下に一定のpHでグリセロールを単一の炭素源として5~20重量%グリセロール溶液の工業的な変換に用い、グリセロールが殆ど消費された後、生成したバイオマスを分離し、生成物混合物を蒸留により処理することを特徴とする方法に関する。

広義の態様においては、本発明は、多くの嫌気性微生物およびいくつかの好気性微生物は、グリセロールを1,3-プロパンジオールに変換し得る酵素を供給するという基本概念に基づいている。従って、本発明により、第1の工程において、微生物株の能力に基づいて適当と思われる株を選択する。この目的のために、クロストリジウム、エンテロバクテリウム、ラクトバチルス、バチルス、シトロバクター、アエロバクターおよび/またはクレブシェラ属から株を選択し、標準的な発酵条件下に5%グリセロール溶液を単一の炭素源として増殖させ、体積/時間収率を測定し、前記の値を越える体積/時間収率を示す株を選択する。本発明において、標準的な発酵条件下とは、例えば菌寄託所が提案するような標準的な培地で培養後、

パンジオールに変換し得る株、例えば酪酸クロストリジウム(*Clostridium butyricum*)SH1(DSM 5431)およびAK1(DSM 5430)並びにクレブシェラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)DSM 2026のようなクレブシェラ・ニューモニエ株およびクレブシェラ・オキシトカ(*K. oxytoca*)NRCC 3006を用いる前記のような方法を提供することである。

[課題を解決するための手段]

従って、本発明は、微生物によりグリセロールを1,3-プロパンジオールに変換する方法であって、まず、標準的な発酵条件下に5重量%グリセロール溶液を単一の炭素源として体積/時間収率0.5g/h以上でグリセロールを1,3-プロパンジオールに変換する微生物株を、クロストリジウム、エンテロバクテリウム(*Enterobacterium*)、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)、バチルス(*Bacillus*)、シトロバクター(*Citrobacter*)、アエロバクター(*Aerobacter*)およびクレブシェラ属から選択し、次いで、その株を、嫌気的条件

微生物を、窒素源(例えば酵母エキス)をも含有するが炭素およびエネルギー源としてはグリセロールのみを含有する塩培地に移すことを意味する。とりわけクレブシェラに適当な標準培地は、実施例2(発酵培地)に記載されている。このことは、文献のデータに従って他の株にも適用し得る。

本発明によると、pH値を、工業的発酵条件下に一定に保つか、または調節しなければならない。適当なpH値は6~9、好ましくは6.5~8の範囲内である。

本発明によると、特に適当な株は、以下の微生物属から選択し得ることがわかった: クロストリジウム・ペーフリンジェンス(*C. perfringens*)、クロストリジウム・バストイリアヌム(*C. pasteurianum*)、クロストリジウム・アセトブチリクム(*C. acetobutylicum*)、クロストリジウム・ブチリクム(*C. butylicum*)、酪酸クロストリジウム、クロストリジウム・バイエリンキ(*C. beijerinckii*)、クロストリジウム・カントトイ(*C. kantongi*)、ラクトバチルス・ブレビス

(*L. brevis*)、ラクトバチルス・ブフネリ(*L. buchneri*)、シトロバクター・フロインディ(*C. freundii*)、エロバクター・エロゲネス(*A. aerogenes*)、クレブシェラ・ニューモニエ、シトロバクター・インターメジウム(*C. intermedium*)、クレブシェラ・エロゲネス(*K. aerogenes*)およびクレブシェラ・オキシトカ。これらのうち、クレブシェラ・ニューモニエ DSM 2026 およびクレブシェラ・オキシトカ N R C C 3006 およびシトロバクター・フロインディ(DSM 30040 または 30039)並びにそれらの突然変異体または変種が特に好ましい。他の適当な株は、クレブシェラ・プランティコラ(*K. planticola*)、とりわけクレブシェラ・プランティコラ IAM 1133 並びにその突然変異体および変種である。株の酵素供給が重要な選択基準であることは、当業者に明らかである。従って、本発明において使用する株は、遺伝子工学手法によりグリセロールの 1,3-プロパンジオールへの変換のために重要な酵素供給を付与された株をも包含する。

ライト)抑制が起こると考えられる限りにおいて、なおさら驚くべきことである。

本発明の方法は、純粋なグリセロールの溶液を用いて行い得るだけでなく、通常、トリグリセリドの工業的加工により、例えば脂肪酸トリグリセリドの蒸気による水素化、または脂肪酸トリグリセリドのエステル交換により生じるグリセロール水を用いて行い得る。このようなグリセロール水は、主として水およびグリセロールを含有するが、出発物質または工程に由来する不純物も少し含む。

本発明によると、未処理グリセロール水が出発物質として好ましく、獸脂およびラウリン酸含量の低い他のトリグリセリドの水素化によって生じるものが出発物質として特に好ましいことがわかった。

本発明の方法を行うために、本発明に従って選択した微生物株を、まず前培養培地で培養することが好ましい。適当な前培養培地は、グリセロールおよび/または他の炭素源(例えばグルコース)および窒素源(例えば酵母エキス)を更に含有する

本発明の方法を行うのに特に好ましい株は、酪酸クロストリジウム SHI (DSM 5431) および A K I (DSM 5430) である。これらの株は、土壤および泥の試料をバストール殺菌後、グリセロール含有培地中で、該試料からプロパンジオール生成のために濃厚化されたものである。このような株は、次のような性質を示す: 炭水化物なしに PY 培地で増殖する、グルコース鉄酸塩ビオチン培地で増殖する、ゼラチンを加水分解しない、糖利用スペクトルが、糖メレジトースおよびリボースに関してクロストリジウム・アセトブチリクムに相当する。前記株は、クレブシェラ株よりも非常に好ましいので、リスククラス 1(2 に対して)とし得る。これらは、本発明の方法において、特に高いグリセロール変換を示す。

本発明によると、微生物学的基準とは異なり、20 重量%まで、好ましくは 5 ~ 15 重量%、より好ましくは 10 ~ 15 重量% の非常に高濃度のグリセロールを使用し得ることがわかった。このことは、このような高濃度では通常異化(カタボ

塩培地である。

この前培養工程は、発酵槽に導入するのに充分なバイオマスが生成するまで続けることが好ましい。通常、前培養の炭素源が完全にまたは実質的に完全に消費されてから発酵槽に導入する。

発酵槽培地は、前培養培地とは異なり、比較的小量のホスフェートおよびカリウムを含有する。

通常、前培養培地および発酵槽培地のいずれもが、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウムおよびカルシウムのカチオン並びにホスフェート、スルフェートおよびクロリドのアニオンを含有し得る。

更に、発酵槽培地は、微量元素、とりわけ亜鉛、鉄、マンガン、銅、コバルト、ホウ素および/またはモリブデンをも含有することが好ましい。

発酵槽培地の詳しい組成は、当業者が、関連文献から、または微生物株寄託の提案から知ることができる。例えば次の文献を参照し得る: エバンス (C. G. T. Evans)、ヘバート (D. Hebert) およびテンペスト (D. W. Tempest)、1970 「ザ・コン

ティニュアス・カルティベーション・オブ・ミクロ-オーガニズムズ、2. コンストラクション・オブ・ア・ケモスタット(*The Continuous Cultivation of Micro-organisms, 2. Construction of a Chemostat*)」、メソッズ・イン・ミクロビオロジー(*Methods in Microbiology*)、2、アカデミック・プレス(*Academic Press*)、277~327頁およびストリークストラ、タイクセイラ・デ・マットス(*M. J. Teixeira de Matos*)、ネイッセル(*O. W. Neijssel*)およびテンペスト、1987「オーバーフロー・メタボリズム・デューリング・アンエアロビック・グロース・オブ・クレブシェラ・エアロゲネスNTCC418・オン・グリセロール・アンド・ジヒドロキシアセトン・イン・ケモスタット・カルチャー(*Overflow Metabolism during Anaerobic Growth of Klebsiella aerogenes NTCC 418 on Glycerol and Dihydroxyacetone in Chemostat Culture*)」、アーカイブズ・オブ・ミクロビオロジー(*Archives of Microbiology*)、147、268~275頁。

器内に残る比較的高沸点の成分、すなわち栄養塩と発酵生成物との混合物を、次いで例えば薄層蒸発器に導入し得る。得られる濃縮物を、精留および短路蒸留(*kurzwegdestillation*)によって分離して、1,3-プロパンジオールおよび要すれば2,3-ブタンジオールのような副生成物を得ることができる。

本発明の方法によると、グリセロールを実質的に化学量論的に1,3-プロパンジオールに変換することが可能である。1,3-プロパンジオールの収量は、しばしばグリセロール3モルにつき2モルのオーダーである。本発明においては、実質的に少なくとも80%、好ましくは95%、とりわけ99%以上のグリセロール消費を意図すると理解される。

1,3-プロパンジオールに加えて、2,3-ブタンジオール、アセトイン、エタノールまたは酢酸および/または乳酸のような他の重要な有用生成物も生成し得る。

発酵は、剪断速度の小さい層流攪拌機付き発酵

嫌気性株を使用する場合、発酵は、酸素の不存在下に、好ましくは窒素雰囲気中で行う。好ましい一態様においては、発酵を気体状の発酵副生成物の雰囲気中で行う。

本発明の方法を工業的規模で行うために、前培養器に適当な接種物を導入し、次いで栄養液と組み合わせ得る。接種物の量は、バッチ全量に対して、好ましくは5~20体積%、より好ましくは8~15体積%である。溶液中に生成する微生物懸濁液を、次いでグリセロールと共に発酵タンクまたは発酵タンクのカスケードに導入する。次いで、他の助剤を発酵槽またはカスケードに添加し得る。例えば、抑泡剤または遮過助剤を添加し得る。次いで、回収のために、培養液を、メンブランフィルタープレス内でバイオマスから連続的に分離するか、または遮過(例えばミクロ遮過)によって有用生成物を連続的に分離する。生成したバイオマスを洗浄して洗液を滤液と合した後、水および低沸点成分を、蒸発器内で連続的または非連続的に、少なくとも部分的に除去し得る。蒸発

槽中で行うのが最もよいことがわかった。この種の攪拌機は、当業者によく知られている。高い剪断速度は本発明において悪影響を及ぼすが、層流によりそのようなことが避けられる。

更に、エネルギー供給を小さく保つことが好ましい。当業者は、エネルギー供給を、発酵温度27~40℃、好ましくは33~38℃で、エネルギー供給が発酵温度を上昇することなく保つように調節し得る。すなわち、エネルギー供給は、好ましくは1KWh/m³以下、より好ましくは0.75~0.2KWh/m³である。

[実施例]

実施例1

種々のグリセロール源によるクレブシェラ・ニューモニエの増殖のボトル試験

微生物: クレブシェラ・ニューモニエDSM 2026

培地:

K ₂ HPO ₄	3.383 (g/l)
K ₂ HPO ₄	1.293
NH ₄ Cl	5.35
Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	0.64
クエン酸 · H ₂ O	0.42
MgCl ₂	0.12
CaCl ₂	0.0022
酵母エキス	1.00
グルコース	3.00

この培地をオートクレープに入れる前にpH 7.

2に調節した。

培養:

微生物を、前記塩培地で一晩培養した。培地は、100 ml 培養ボトル中で嫌気的条件下(N₂ガス相)に37°Cでインキュベートした。インキュベーション後、増殖試験の接種物として培養液1 mlを使用した。2試験を行い、各場合において異なるグリセロール源を用いた。使用した培地は、前記塩培地であるが、グルコースを2.0 g/l量のグリセロ

第1表

供給	光学密度の 最大上昇	グリセロール 初期濃度(mM)	グリセロール消費 (%)	(mM)	エタノール (mM) ^a	(%) ^b	アセテート (mM) ^a	(%) ^b
グリセロール	1.18	212.5	50.8	108.2	2.9	2.8	18.0	16.9
臓脂由来グリセロール	1.26	198.4	52.6	104.4	3.6	3.5	19.6	18.8
ヤシ油由来グリセロール	1.15	208.2	54.6	114.2	3.8	3.3	19.5	17.4

供給	アセトイソイ (mM) ^a	(%) ^b	2,3-ブタンジオール (mM) ^a	(%) ^b	1,3-プロパンジオール (mM) ^a	(%) ^b
グリセロール	0.3	0.2	12.5	11.7	81.4	76.4
臓脂由来グリセロール	2.4	2.3	8.8	8.5	82.4	79.1
ヤシ油由来グリセロール	1.8	1.6	7.3	6.4	70.1	61.9

注: ^a 生成物nmol/代謝グリセロール100 nmol^b 48時間インキュベート後の濃度

実施例2

グリセロールから1,3-プロパンジオールへのバッチ式発酵

微生物: クレブシェラ・ニューモニエDSM2
026

培地:

前培養培地:

K₂HPO₄ 3.383(g/l)

KH₂PO₄ 1.293

NH₄Cl 5.35

Na₂SO₄·10H₂O 0.64

クエン酸·H₂O 0.42

MgCl₂ 0.12

CaCl₂ 0.0022

グリセロール 20.00

酵母エキス 1.00

グルコース 3.00

この培地をオートクレープに入れる前にpH 7.2に調節した。

発酵槽培地:

発酵中に市販の抑泡剤の添加を行った。

培養:

培養ボトル中嫌気的条件(N₂ガス相)下に37°Cで約24時間培養することによって接種物(5%)を調製した。

SGI[セトリック・ジェニー・インダストリアル(Seetric Genie Industrial)]の温度、pHおよびrpm測定および調節装置付きのSGI製4.5l発酵槽内で発酵を行った。発酵は、嫌気的条件(N₂ガス相)下に37°C/pH 7(2.5N-NaOH添加により調節)で、グリセロール(p.a.)50、100、150および200g/lを含有する塩培地(酵母エキス0.1%)を用いて行った。

発酵の結果を次の表に示す。

50および100g/lのグリセロールを用いた発酵においては、基質の99%が変換された。150g/lの場合は、約90%のグリセロールが変換された。

最高の1,3-プロパンジオール濃度は、150g/lにおいて達成され(759mMまたは5.8g

NaH₂PO₄·2H₂O 1.56(g/l)

NH₄Cl 5.35

KCl 0.75

Na₂SO₄·10H₂O 0.64

クエン酸·H₂O 0.42

MgCl₂ 0.12

CaCl₂ 0.0022

グリセロール 表参照

酵母エキス 1.00

微量元素濃度:

いずれの培地も、以下の濃度の微量元素を含有していた:

ZnCl₂ 3.42(mg/l)

FeCl₃·6H₂O 27.00

MnCl₂·4H₂O 10.00

CuCl₂·2H₂O 0.85

CoCl₂·6H₂O 2.38

H₃BO₃ 0.31

Na₂MoO₄ 0.02

抑泡剤:

/l)、最高の体積/時間収率(VTY)は、グリセロール濃度100g/lにおいて達成された(2.3g/h/l)。

同様のバッチ式発酵を、1l規模でシトロバクター・フロインディの株を用いて行った。シトロバクター・フロインディDSM30039株は、50g/lのグリセロールを用いる発酵において好ましい結果を示した。

第2表

菌株	グリセロール 濃度 (g/l)	グリセロール 消費(モル%)	エタノール (mM)	(モル%)	アセテート (mM)	(モル%)	2,3-ブタンジオール (mM)	(モル%)
クレブシェラ・ ニューモニエ DSM 2026	50.9	99.4	22.8	4.1	87.6	15.9	3.6	0.7
	96.9	99.9	65.0	6.2	188.2	17.9	10.4	1.0
	154.1	88.5	110.5	7.5	205.5	13.9	10.8	0.7
	201.7	53.0	91.5	7.9	108.5	9.3	1.4	0.1
シトロバクター・ フロインディ	52.9	100.0	10.7	1.8	134.1	23.1	--	--

菌株	D(-)ラクテート (mM)	(モル%)	1,3-プロパンジオール (mM)	(モル%)	Y T Y (g/h/l)	収率(理論最大値 66.66%に対して)
クレブシェラ・ ニューモニエ DSM 2026	32.3	5.9	294.4	53.5	22.4	1.4
	39.7	3.8	568.4	54.0	43.2	2.3
	169.6	11.4	759.2	51.2	57.7	1.5
	122.7	10.6	419.5	36.1	31.9	0.4
シトロバクター・ フロインディ	12.7	2.1	370.0	64.0	28.2	1.2

実施例 3

実施例 2 と同様の条件下に発酵を行った。発酵は、3 l の規模で、37°C / pH 7 (5 N - NaOH 添加により調節) で 200 回転/分で攪拌しながら行った。試験中、反応器を窒素でバージ (0.3 NL / 分) して、嫌気的条件を保持した。

牛脂に由来する粗グリセロールを使用し、グリセロール濃度を変えて (90 および 140 g/l) 発酵を行った。いずれの試験においても、グリセロール 90 % 以上が代謝された。得られた結果を次表に示す：

第3表

グリセロール源	グリセロール濃度(g/l)	グリセロール消費(モル%)	エタノール(mM)	アセテート(mM)	2,3-ブタンジオール(mM)	D(-)ラクテート(mM)
牛脂(ヘンケル社)	89.9 139.3	99.9 99.1	69.7 174.4	168.8 186.0	15.4 11.2	43.7 184.7

グリセロール源	1,3-プロパンジオール(mM)	Y T Y(g/h/l)	1,3-プロパンジオール収率(理論最大値66.66%に対して)
牛脂(ヘンケル社)	548.5 807.5	41.7 61.4	2.0 1.7
			84 81

実施例4

酪酸クロストリジウムSH1およびAK1をバッチ式培養に用いて、1l発酵槽(BCC)内で試験を行った。培養体積は約700mlであった。培地の組成は以下の通りであった(1l当たり):

K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5g/100gグリセロール
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	20 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
酵母エキス	1 g

微量元素溶液

グリセロール 表示量。

pH値はいずれの場合も7に一定に保ち、温度は32°Cとした。グリセロールを供給しながらのFEDバッチ培養を同様に行った。結果を第4~7表に示す。

第4表

菌株	グリセロール		O.D. 660nm	μ_{max}/h	生成物 (nmol/l)			グリセロールに 対する収率(%)	
	利用可能	消費			1,3-プロパン ジオール	酢酸	酪酸	全体	ジオール
	%	nmol/l	nmol/l						
SH 1	2	240	240	3.4	0.56	153	26	18	80
	5	554	554	6.2	0.42	381	31	46	91
	11	1197	1087	6.2	0.27	740	18	128	93
	PB*	956	896	5.2	--	550	41	83	85
AK 1	2	236	229	2.9	0.56	143	9	26	82
	5	516	516	4.4	0.30	388	46	46	(102)
	PB*	1203	1137	5.3	--	774	85	96	92

* Fedバッチ培養

第5表

菌株	グリセロール		時間 (時間)	生成物 (nmol/l)		生産性 (g/l/h)	
	%	消費 g/l		1,3-プロパン ジオール	酢酸+酪酸	グリセ ロール	ジオール
SH 1	2	22.1	9.5	11.6	2.2	2.3	1.2
	5	51.0	13	30.0	5.8	3.9	2.2
	11	100.0	29	56.2	11.2	3.4	1.9
	PB*	82.4	22	41.8	9.4	3.7	1.9
AK 1	2	21.1	9.5	10.7	2.8	2.2	1.4
	5	47.5	14.5	29.5	6.8	3.3	2.0
	PB*	104.6	26	58.8	13.5	4.0	2.3

* Fedバッチ培養

第6表 酪酸クロストリジウムSHによる粗グリセロールの発酵

番号	グリセロール含量 (%)	グリセロールバッヂ	運滯期 (時間)	最大KOH消費速度*
				(nmol/l/h)
1	2	牛脂由来粗グリセロール	2	2.4
2	2	ヤシ油由来粗グリセロール	9	1.6
3	5	牛脂由来粗グリセロール	4	2.4
4	5	牛脂由来、2接種	2	3.0
5	5	ヤシ油由来粗グリセロール	9	1.4
6	5	ヤシ油由来、3接種	8	8

* KOH消費速度はグリセロール消費速度に等しい。

第7表 酪酸クロストリジウムSHによる2%グリセロールの変換に対するpHの影響

pH値	発酵時間 (時間)	変換されたグリセロール (g/l)	生成物 (%)		
			プロパンジオール	酢酸	酪酸
5	(7)	6	6.2	3	3.4
6	12	20	6.7	7	2.5
7	8	20	7.6	7	1.7
7.5	12	20	7.3	1.2	1.4

特許出願人 ヘンケル・コマンディットゲゼルシャフト・アウフ・アクチエン ほか1名

代理 人 弁理士 青山 茂 ほか1名

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5

識別記号

府内整理番号

//C 12 P	7/18
C 12 R	1:01)
(C 12 P	7/18
C 12 R	1:07)
(C 12 P	7/18
C 12 R	1:225)
(C 12 P	7/18
C 12 R	1:145)
(C 12 P	7/18
C 12 R	1:22)

優先権主張 ②0989年7月24日③西ドイツ(DE)④P 39 24 423.7

⑦発明者	フランツーヨーゼフ・カルドウツク	ドイツ連邦共和国 5657 ハーン、ラントシュトラアセ 18番
⑦発明者	ヴォルフーディータ ー・デツクヴエル	ドイツ連邦共和国 2900 オルデンブルク、オルムスヴェ ーク 56番
⑦発明者	カルメン・ターク	ドイツ連邦共和国 3300 ブラウンシュヴァイヒ、ガーベ ルスベルガー・シュトラアセ 6番
⑦発明者	ハンノ・ビーブル	ドイツ連邦共和国 3340 ヴォルフエンビュッテル、トウ ルベンヴエーク 2番
⑦出願人	ゲゼルシヤフト・フュ ア・ビオテヒノロギシ エ・フォルシュング・ ミット・ペシュレンク テル・ハフツング	ドイツ連邦共和国 3300 ブラウンシュヴァイヒ、マシエ ローダー・ヴエーク 1番